

УДК 594.124:591.4(262.5)

В. Н. Новицкая, А. А. Солдатов

**ОСОБЕННОСТИ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ МОРФОЛОГИИ  
ЭРИТРОИДНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ ГЕМОЛИМФЫ  
ДВУСТВОРЧАТОГО МОЛЛЮСКА ANADARA  
INAEQUALVIS, ЧЁРНОЕ МОРЕ**

При помощи методов световой микроскопии исследовали особенности функциональной морфологии и цитометрии эритроидных элементов гемолимфы двустворчатого моллюска *Anadara inaequalvis* Bruguiere. Показано, что эритроциты *A. inaequalvis* являются узкоспециализированными клетками с высоким содержанием гемоглобина ( $180,64 \pm 32,51$  пг), повышенной удельной поверхностью ( $1,558 \pm 0,002$  мкм<sup>-1</sup>) и функционально малоактивным ядром, о чем свидетельствует крайне низкое значение ядерно-плазматического отношения ( $0,083 \pm 0,001$ ). Ядро клетки имеет незначительный объём ( $29,93 \pm 0,73$  мкм<sup>3</sup>) с высокой долей гетерохроматина. Цитоплазма эритроцитов содержит гранулярные включения в количестве  $41,95 \pm 2,75$  единиц на клетку, которые не являются постоянными структурами; их присутствие связано с функциональной активностью клетки. При ядерно-плазматическом отношении, близком к 0,04, включения практически не выявляются. Гемолимфа моллюска не содержит эритроидных элементов на ранних стадиях дифференцировки, что отражает нерегулярность эритропоэтических процессов.

**Ключевые слова:** *Anadara inaequalvis*, эритроциты, эритроцитарные индексы, морфология клетки, цитометрия.

*Anadara inaequalvis* — двустворчатый моллюск, широко распространенный в бассейнах Индийского и Тихого океанов [25]. В Средиземное море он попал из Атлантики в 1969 г. В 1981 г. был обнаружен по всему шельфу западной части Чёрного моря [1, 17]. К 1994 г. *A. inaequalvis* успешно освоила южный регион Азовского моря [1], а в 1999 г. была впервые зарегистрирована в акваториях Южного берега Крыма на глубине 23 м [12]. В настоящее время этот моллюск является доминирующим в макрозообентосных сообществах северокавказского и северо-западного шельфов Чёрного моря [3, 23, 27].

*A. inaequalvis* — эврибионтный вид, способный существовать в широком диапазоне солёности и температуры [24]. Особый интерес представляет его устойчивость к экстремальным формам гипоксии и аноксии [22]. Даже при чрезвычайно низких концентрациях кислорода (насыщение менее 1,2%)

© Новицкая В. Н., Солдатов А. А., 2013

*A. inaequalis* удерживает норму потребления кислорода [14], а в условиях аноксии показывает самое высокое сохранение энергии. Интенсивность потребления кислорода в условиях нормоксии у данного вида в пять-шесть раз меньше, чем у других видов черноморских двустворок, а тканевой метаболизм изначально имеет анаэробную ориентацию [9]. При температуре 20°C *A. inaequalis* может выживать в условиях аноксии около одного месяца [18].

Устойчивость к аноксии связывают также с наличием в гемолимфе моллюска эритроцитарного гемоглобина [21]. Эритроциты, имеющие форму двояковыпуклого диска — наиболее массовый тип клеток в её гемолимфе. По данным электронной микроскопии, в них обнаружены: комплекс Гольджи, гранулярный ретикулум, митохондрии и микротрубочки [18]. Показано [20], что в отличие от других видов гидробионтов, эритроциты *A. inaequalis* в условиях аноксии не подвергаются лизису [6, 30] и проявляют способность к анаэробному метаболизму [29, 31]. Вместе с тем, информация о морфофункциональных характеристиках клеток красной крови *A. inaequalis* (содержание гемоглобина, объём, поверхность, удельная поверхность, ядерно-плазматические отношения и др.) практически отсутствует, тогда как она может иметь существенное значение для характеристики респираторных свойств гемолимфы моллюска. Именно этим аспектам проблемы и посвящена настоящая работа.

**Материал и методика исследований.** Объектом исследований служили особи *A. inaequalis* одного срока оседания, размеры раковины: длина — 30—33 мм, высота — 17—22 мм. Материал был получен с коллекторных установок рыбодобывающего предприятия «Дон-Комп» (бухта Стрелецкая, Севастополь, Крым). Животных транспортировали в пластмассовых контейнерах насыпью без воды в течение одного часа с момента сбора. Перед отбором проб гемолимфы для снятия реакции стресса животных выдерживали в аквариумах с проточной морской водой в течение трёх суток при температуре 20—21°C, солёности 17—18‰ и фотопериоде 12 : 12.

Гемолимфу получали пункцией из экстрапаллиального пространства, приоткрыв створки раковины. Концентрацию гемоглобина устанавливали гемиглобинцианидным методом с применением стандартного набора реактивов ООО «Агат-мед» (Россия). Количество эритроидных элементов подсчитывали в камере Горяева [2]. Гематокрит определяли путём центрифугирования образцов гемолимфы в гепаринизированных капиллярах (750 г, 30 мин) в специальном гематокритном роторе (центрифуга MPW-310, Польша). На основании полученных значений рассчитывали эритроцитарные индексы: среднечеточное содержание (*MCH*) и среднечеточную концентрацию гемоглобина (*MCHC*). Расчеты выполняли по формулам [2]

$$MCH = \frac{Hb}{Er};$$

$$MCHC = 10 \frac{Hb}{Ht},$$

где  $Hb$  — концентрация гемоглобина, г/л;  $Er$  — количество эритроцитов,  $\text{мкл}^{-1}$ ;  $Ht$  — гематокрит, %.

Перед изготовлением мазков для цитологических исследований эритроидную массу трижды отмывали в изотоничном растворе NaCl (0,85%) путём центрифугирования (750 г, 15 мин). Это связано с высоким содержанием в ней солей, которые при высыхании мазка активно кристаллизуются. Мазки окрашивали по комбинированному методу Паппенгейма (Май — Грюнвальд + Романовский — Гимза) [2] и на них изучали морфологические и цитометрические характеристики эритроидных элементов. При помощи окуляр-микрометра измеряли большой и малый диаметры клеток ( $C_1$ ,  $C_2$ ) и их ядер ( $N_1$ ,  $N_2$ ), а также устанавливали их морфологические особенности. Измерения проводили под иммерсией при увеличении  $\times 1500$ . Объём выборки составлял 100 клеток на один мазок при определении линейных параметров и 1000 клеток — при анализе морфологии эритроидных элементов.

Для расчета площади поверхности ( $S_c$ ) эритроцита использовали уравнение [19]

$$S_c = 2\pi a^2 b + \frac{2\pi ab \sinh^{-1} e}{e},$$

где  $a = \frac{c_1 + c_2}{4}$ ;  $e = \frac{\sqrt{a^2 - b^2}}{a}$ ;  $b = 0,67h$ ;  $h$  — толщина эритроцита,  $\text{мкм}$  [11]:

$$h = 1,8 + 0,0915 \cdot (C_1 - 7,5).$$

Объём клетки ( $V_c$ ) рассчитывали по [19] с модификацией. Так как эритроциты у *A. inaequalis* содержат ядро, то к объёму клетки добавляли объём ядра ( $V_n$ ):

$$V_c = 0,7012 \cdot \left( \frac{c_1 + c_2}{2} \right)^2 \cdot h + V_n.$$

Объём ( $V_n$ ) и площадь поверхности ( $S_n$ ) ядра определяли по формулам эллипсоида вращения [10]

$$V_n = \frac{\pi N_1 N_2^2}{6},$$

$$S_n = 4\pi^p \sqrt{\frac{2 \left( \frac{N_1}{2} \right)^p \left( \frac{N_2}{2} \right)^p + \left( \frac{N_2}{2} \right)^{2p}}{3}},$$

где  $p = 1,6075$ .

На основании полученных объёма и площади поверхности эритроцитов и их ядер были определены удельная поверхность этих структур ( $S_c/V_c$  и  $S_n/V_c$ ), а также рассчитано ядерно-плазматическое отношение ( $V_n/V_c$ ).

Цифровой материал обработан статистически при помощи  $t$ -критерия Стьюдента. Результаты представлены в виде  $\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$ . Нормальность распределения выборочных совокупностей проверяли при помощи критерия Пирсона. Объем выборки — 17 особей.

### Результаты исследований и их обсуждение

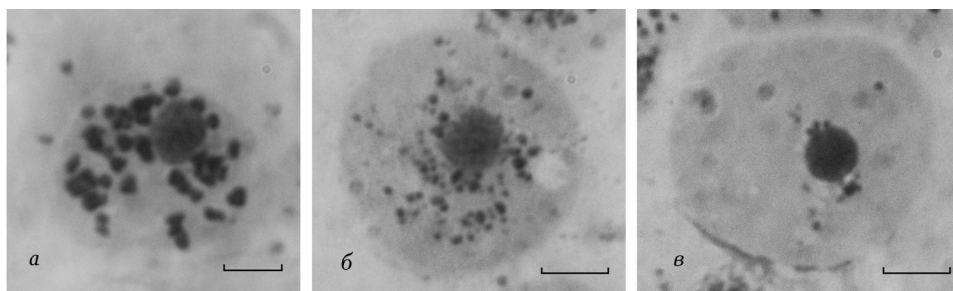
Зрелые эритроидные элементы гемолимфы *A. inaequalvis* имеют практически округлую форму, их линейные размеры  $C_1 = 14,54 \pm 0,59$  и  $C_2 = 12,76 \pm 0,61$  мкм, разница между ними не превышала 2 мкм —  $1,79 \pm 0,06$  мкм. Клетки сравнительно крупные: среднеклеточный объем ( $V_c$ ) и площадь поверхности ( $S_c$ ) составляли  $359,39 \pm 9,28$  мкм<sup>3</sup> и  $558,69 \pm 14,04$  мкм<sup>2</sup>, при этом удельная поверхность клетки ( $S_c/V_c = 1,558 \pm 0,002$  мкм<sup>-1</sup>) была сопоставима с таковой других гидробионтов (морских рыб) [5]. Высокая удельная поверхность эритроцита *A. inaequalvis* облегчает диффузию кислорода через оболочку и его ассоциацию с гемоглобином, а также повышает её способность к деформации в момент циркуляции.

Цитоплазма ацидофильная вследствие высокого содержания гемоглобина. Значение  $MCH$  составляло  $180,64 \pm 32,51$  пг. При этом значение  $MCHC$  соответствовало известным для других водных организмов —  $22,12 \pm 3,25\%$  [7].

Эритроциты *A. inaequalvis* содержат ядро. Оно имеет округлую форму, располагается эксцентрично и занимает приблизительно 1/12 объема клетки. Это компактное образование ( $V_n = 29,93 \pm 0,73$  мкм<sup>3</sup>) базофильной окраски с высокой долей гетерохроматина, что отражает его низкую функциональную активность. Большой и малый диаметры ( $N_1$  и  $N_2$ ) ядра составляли соответственно  $4,25 \pm 0,14$  и  $3,57 \pm 0,15$  мкм. Площадь поверхности ядра ( $S_n$ ) —  $45,99 \pm 0,74$  мкм<sup>2</sup>, удельная поверхность ( $S_n/V_n$ ) равна  $1,643 \pm 0,015$  мкм<sup>-1</sup>. Отличительной особенностью эритроцитов моллюска являлось крайне низкое значение ядерно-плазматического отношения ( $V_n/V_c$ ) —  $0,083 \pm 0,001$ .

Таким образом, можно констатировать, что ядерные эритроциты *A. inaequalvis* представляют собой узкоспециализированные клетки с подавленной функцией ядра и, как следствие, ограниченным сроком функционирования. При просмотре препаратов нами не были обнаружены эритроидные элементы на ранних стадиях дифференцировки, обладающие базофильной цитоплазмой и крупными ядрами с высоким уровнем эухроматина [8]. Это отражает крайне низкую интенсивность эритропоэтических процессов и, вероятно, значительную продолжительность жизни эритроцитов у данного вида моллюска.

Следует отметить, что в гемолимфе *A. inaequalvis* достаточно высока доля клеток с признаками лизиса ( $13,3 \pm 2,1\%$ ). Это косвенно свидетельствует о значительном возрасте клеточной массы [26]. Известно, что у ряда гидробионтов кроветворная ткань на протяжении годового цикла функционирует ограниченный промежуток времени (2—3 мес), который приурочен к постнерестовому периоду [4]. В остальное время эритроцитарная масса рав-



1. Соотношение между размерами клетки и количеством зернистых включений: *a* —  $V_n/V_c \approx 0,09$ ; *б* —  $V_n/V_c \approx 0,06$ ; *в* —  $V_n/V_c \approx 0,04$ ; масляная иммерсия,  $\times 1500$ ; масштабная линейка — 5 мкм.

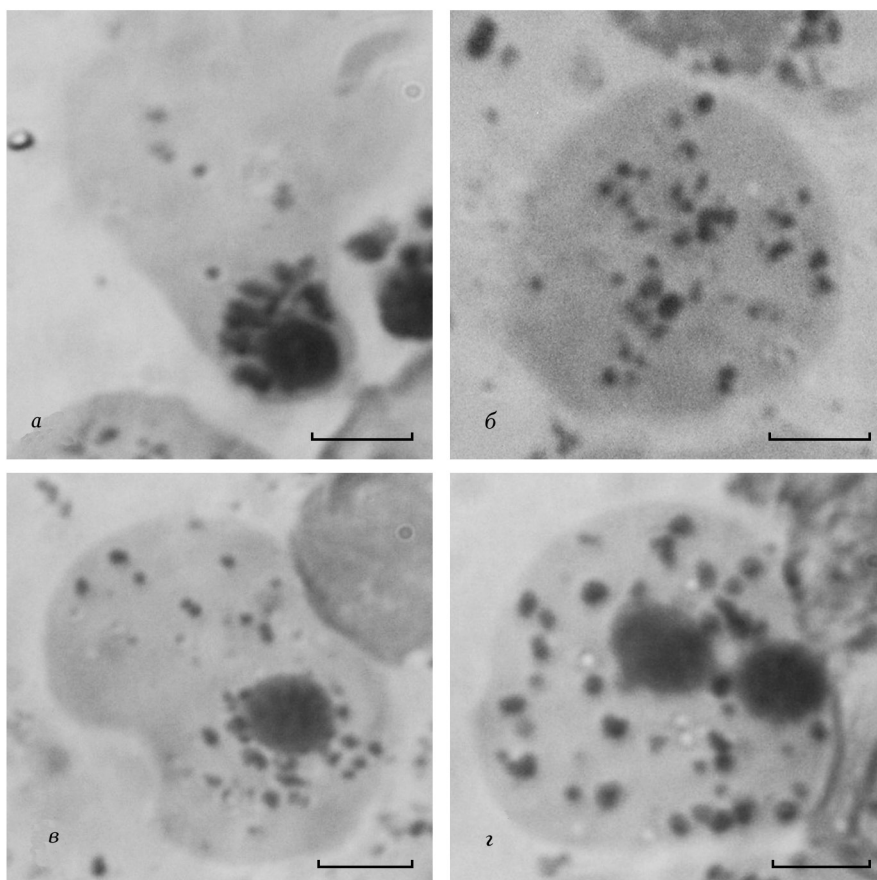
номерно стареет, что находит отражение в морфологических характеристиках клеток. Не исключено, что эта особенность эритропоэза характерна и для моллюсков.

Отличительной чертой эритроцитов *A. inaequalvis* являлось наличие в цитоплазме крупных базофильных зернистых включений размером 0,33—0,66 мкм, расположенных вблизи ядра в количестве  $41,95 \pm 2,75$  единиц на клетку (рис. 1, *a*).

Природа этих включений исследуется уже на протяжении более чем 120 лет начиная с работы [15]. Показано, что они характерны не только для эритроцитов *A. inaequalvis*, но и ряда других морских беспозвоночных [13, 16]. По данным электронной микроскопии, это округлые, сравнительно однородные образования, не имеющие какой-либо внутренней организации [18]. Гистохимические исследования позволили выявить в них пероксидазную и слабую лизосомальную активность, железо, жиры, витамин С [18]. Авторы сходятся во мнении, что эти включения содержат уникальный гем, входящий в состав гематина, который используется как резерв железа при синтезе гемоглобина [18, 28]. При этом с гематином связывают способность моллюска нейтрализовать повышенную концентрацию сульфидов, которая практически всегда сопровождает гипоксические и аноксические условия морской среды [28].

Впервые нами установлено, что зернистые включения в цитоплазме эритроцитов *A. inaequalvis* не являются постоянными образованиями. По мере снижения функциональной активности клетки, то есть при уменьшении значений ядерно-плазматического отношения ( $V_n/V_c$ ), эти структуры постепенно исчезают. При  $V_n/V_c \approx 0,09$  зёрна хорошо представлены в цитоплазме клетки, при  $V_n/V_c \approx 0,06$  размеры зёрен существенно уменьшаются, а при  $V_n/V_c \approx 0,04$  они практически не встречаются (см. рис. 1, *a*, *б*, *в*).

Отмечено также, что данные включения располагаются преимущественно вблизи ядра клетки. Это хорошо заметно при энуклиации, когда ядро выталкивается из клетки вместе со скоплением зёрен, что позволяет предполо-



2. Эритроидные элементы гемолимфы *A. inaequalvis*: а — энуклиация; б — безъядерная клетка; в — amitотический цитокинез; г — двухядерная клетка; масляная иммерсия,  $\times 1500$ ; масштабная линейка — 5 мкм.

жить их связь с гранулярным ретикулумом (рис. 2, а). Подобные события отмечали в  $0,76 \pm 0,26\%$  случаев.

Энуклиация может сопровождаться и образованием безъядерных клеток (см. рис. 2, б). Их наблюдали в гемолимфе моллюска в  $1,8 \pm 0,2\%$  случаев. К этому же могут приводить и процессы amitотического цитокинеза ( $1,2 \pm 0,2\%$ ) при сохранении ядра в одной из дочерних клеток (см. рис. 2, в). Изредка наблюдали эритроциты с двумя ядрами со сравнительно высокой долей эухроматина ( $1,20 \pm 0,21\%$ ) (см. рис. 2, г). Это, по-видимому, является следствием того, что процессы карио- и цитокинеза эритроидных элементов у *A. inaequalvis* могут не совпадать во времени.

### Заключение

Таким образом, эритроциты гемолимфы *A. inaequalvis* — это узкоспециализированные клетки с высоким содержанием гемоглобина, повышенной удель-



ной поверхностью и функционально малоактивным ядром, о чем свидетельствует крайне низкое значение ядерно-плазматического отношения. Ядро клетки имеет незначительный объём с высокой долей гетерохроматина. Цитоплазма эритроцитов содержит гранулярные включения, которые не являются постоянными структурами. Их присутствие связано с функциональной активностью клетки. При ядерно-плазматическом отношении, близком к 0,04, включения практически не выявляются. Гемолимфа моллюска не содержит эритроидных элементов на ранних стадиях дифференцировки, что отражает нерегулярность эритропоэтических процессов.

\*\*

*Досліджували особливості функціональної морфології і цитометрії еритроїдних елементів гемолімфи двостулкового молюска *Anadara inaequivalvis*. Показано, що еритроцити є вузькоспеціалізованими клітинами з високим вмістом гемоглобіну, підвищеною питомою поверхнею і функціонально малоактивним ядром. Ядро клітини незначного об'єму з високою часткою гетерохроматину. Цитоплазма еритроцитів містить гранулярні включення, які не є постійними структурами. Їх присутність пов'язана з функціональною активністю клітини. При ядерно-плазматичному відношенні близькому до 0,04, включення практично не виявляються. Гемолімфа молюска не містить еритроїдних елементів на ранніх стадіях диференціювання, що відображає нерегулярність еритропоетичних процесів в кровотвірній тканині.*

\*\*

*Functional morphology and cytometry features of the bivalve *Anadara inaequivalvis* red blood cells were investigated. Erythrocytes are highly specialized cells, with high hemoglobin content, large specific surface area and functionally low active nucleus. Cell nucleus has small volume with notable heterochromatin content. Erythrocyte cytoplasm contains granular inclusions which are not a constant element. Presence of these granules is associated with functional activity of cells. At the nuclear-cytoplasmic ratio close to 0,04, granular inclusions almost are not detected. Hemolymph does not contain immature red blood cells, which reflects irregularity of erythropoietic processes.*

\*\*

1. Золотарев В.Н., Золотарев П.Н. Двустворчатый моллюск *Cunearca cornea* — новый элемент фауны Чёрного моря // Докл. АН СССР. — 1987. — Т. 297, № 2. — С. 501—502.
2. Золотницкая Р.П. Методы гематологических исследований. Лабораторные методы исследования в клинике (справочник). — М.: Медицина, 1987. — С. 106—148.
3. Колючкина Г.А., Исмаилов А.Д. Параметры экстрапаллиальной жидкости двустворчатых моллюсков — неспецифические биомаркеры кратковременного загрязнения водной среды // Океанология. — 2007. — Т. 47, № 2. — С. 233—240.
4. Маслова М.Н., Тавровская Т.В. Динамика сезонных изменений в системе красной крови низших позвоночных: сезонная динамика эритропоэза у форели *Salmo gairdneri* // Журн. эволюц. биохимии и физиологии. — 1991. — Т. 27. — С. 796—798.

5. Новицкая В.Н. Морфо-функциональные и цитометрические характеристики циркулирующих эритроцитов скорпены (*Scorpaena porcus* L.) // Современные проблемы гидробиологии. Перспективы, пути и методы решений: Материалы III Междунар. науч. конф., Херсон, 17—19 мая 2012 г. — Херсон, 2012. — С. 249—252.
6. Новицкая В.Н., Солгатов А.А. Эритроидные элементы гемолимфы *Aplodactylus inaequalis* (Bruguiere, 1789) в условиях экспериментальной аноксии: функциональные и морфометрические характеристики // Мор. экол. журн. — 2011. — Т. 10, № 1. — С. 56—64.
7. Парфенова И.А., Солгатов А.А. Функциональная морфология циркулирующих эритроцитов бычка-кругляка в условиях экспериментальной гипоксии // Там же. — 2011. — Т. 10, № 2. — С. 59—67.
8. Солгатов А.А. Особенности организации и функционирования системы красной крови рыб (обзор) // Журн. эволюц. биохимии и физиологии. — 2005. — Т. 41, № 3. — С. 217—223.
9. Солгатов А.А., Андриенко Т.И., Головина И.В., Столбов А.Я. Особенности организации тканевого метаболизма у моллюсков с различной толерантностью к внешней гипоксии // Там же. — 2010. — Т. 46, № 4. — С. 284—290.
10. Ташкэ К. Введение в количественную цито-гистологическую морфологию. — Бухарест: Изд-во Академии Респ. Румынии, 1980. — 291 с.
11. Чижевский А.Л. Структурный анализ движущейся крови. — М.: Изд-во АН СССР, 1959. — 474 с.
12. Чихачев А.С., Фроленко Л.Н., Реков Ю.И. Новый вселенец в Азовское море // Рыб. хоз-во. — 1994. — № 3. — С. 40.
13. Bailly X., Vinogradov S. The sulfide binding function of annelid hemoglobins: relic of an old biosystem? // J. Inorganic Biochemistry. — 2005. — N 99. — P. 142—150.
14. Cortesi P., Cattani O., Vitali G. et al. Physiological and biochemical responses of the bivalve *Scapharca inaequalis* to hypoxia and cadmium exposure: Erythrocytes versus other tissues // Mar. Coast. Eutrophication. — 1992. — N 13. — P. 1041—1053.
15. Cuénot L. Études sur le sang et les glandes lymphatiques dans la série animale // Arch. Zool. Exp. Gén. — 1891. — Vol. 2, N 9. — P. 13—19.
16. Glomski C.A., Tamburlin J. The phylogenetic odyssey of the erythrocyte. II. The early or invertebrate prototypes // Histol. Histopathol. — 1990. — N 5. — P. 513—525.
17. Gomoiu M.T. *Scapharca inaequalis* (Bruguiere), a new species in the Black Sea // Cercetari marine. — 1984. — N 17. — P. 131—141.
18. Holden J. A., Pipe R. K., Quaglia A., Ciani G. Blood cells of the arcid clam, *Scapharca inaequalis* // J. Mar. Biol. Assoc. U.K. — 1994. — Vol. 74, N 2. — P. 287—299.
19. Houchin D.N., Munn J.I., Parnell B.L. A method for the measurement of red cell dimensions and calculation of mean corpuscular volume and surface area // Blood. — 1958. — N 13. — P. 1185—1191.



20. Mangum C.P., Mauro N.A. Metabolism of invertebrate red cells: a vacuum in our knowledge. *Circulation, Respiration and Metabolism*. — Berlin: Springer-Verlag, 1985. — P. 280—289.
21. Morello E.B., Solustri C., Froggia C. The alien bivalve *Anadara demiri* (Arcidae): a new invader of the Adriatic Sea, Italy // *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.* — 2004. — Vol. 84, N 5. — P. 1057—1064.
22. Nicholson S., Morton B. The hypoxia tolerances of subtidalmarine bivalves from Hong Kong // *Proc. 10th Intern. Mar. Biol. Workshop: The marine flora and fauna of Hong Kong and Southern China*. — 2000. — P. 229—239.
23. Revkov N.K., Boltacheva N.A., Nikolaenko T.V., Kolesnikova E.A. The soft bottom zoobenthos diversity along the Crimean coastal zone of the Black Sea // *Oceanology*. — 2002. — Vol. 42, N 4. — P. 561—571.
24. Rinaldi E. Alcuni dati significativi sulla proliferazione di *Scapharca inaequalvis* (Bruguiere, 1789) in Adriatico lungo la costa Romagnola // *Bollettino Malacologico*. — 1985. — Vol. 21, N 1—4. — P. 41—42.
25. Sahin C., Emiral H., Okumus I. et al. The Benthic exotic species of the Black Sea: blood cockle (*Anadara inaequalvis*, Bruguiere, 1789: Bivalve) and Rapa whelk (*Rapana thomasiana*, Crosse, 1861: Mollusc) // *J. Anim. Vet. Adv.* — 2009. — N 8 (2). — P. 240—245.
26. Siddall M.E., Measures L.N., Desser S.S. Seasonal changes in erythrocyte osmotic fragility and haematocrit in American plaice infected with *Haemohormidium terranova* // *J. Fish Biol.* — 1995. — Vol. 47, N 1. — P. 1—6.
27. Skolka M., Preda C. Alien invasive species at the Romanian Black Sea coast — present and perspectives // *Travaux du Muséum National d'Histoire Naturelle «Grigore Antipa»*. — 2010. — Vol. 53. — P. 443—467.
28. Vismann B. Hematin and sulfide removal in hemolymph of the hemoglobin-containing bivalve *Scapharca inaequalvis* // *Mar. Ecol. Prog. Ser.* — 1993. — Vol. 98. — P. 115—122.
29. Zwaan A., Cattani O., Putzer V.M. Sulfide and cyanide induced mortality and anaerobic metabolism in the arcid blood clam *Scapharca inaequalvis* // *Comp. Biochem. Physiol. C: Comp. Pharm.* — 1993. — Vol. 105, N 1. — P. 49—54.
30. Zwaan A., Cortesi P., van den Thillart G. et al. Differential sensitivities to hypoxia by two anoxia-tolerant marine molluscs: a biochemical analysis. // *Mar. Biol.* — 1991. — Vol. 111. — P. 343—351.
31. Zwaan A., Cortesi P., van den Thillart G. et al. Energy metabolism of bivalves at reduced oxygen tensions // *Mar. coast. eutrophication*. — 1992. — N 13. — P. 1029—1040.